

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biológia Doktori Iskola

## **Tenyészetes epitélsejt modellek alkalmazása biológiailag aktív peptidek és adjuváns terápiás szerek hatásának vizsgálatára**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Gróf Ilona**

**Témavezetők:** **Dr. Deli Mária**, tudományos tanácsadó  
**Dr. Bocsik Alexandra**, tudományos munkatárs

Biofizikai Intézet, Biológiai Barrierék Kutatócsoport  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont



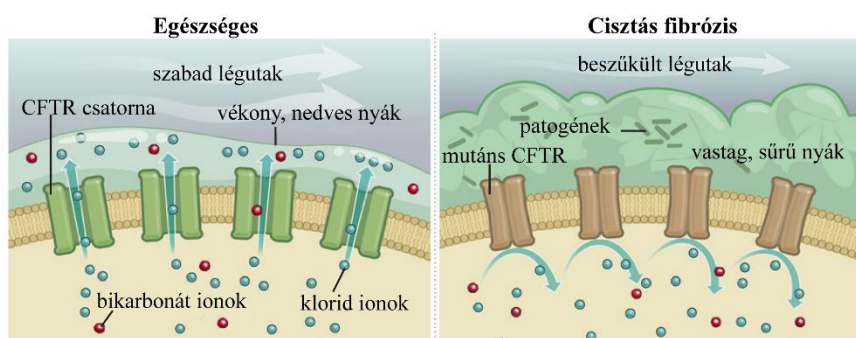
Szeged

2021

## 1. BEVEZETÉS

Az epitelsejtes biológiai gátrendszerek fő feladata a szervezet elválasztása a külső környezettől. Ilyen gátrendszernek tekinthetők a légző- és a bélhám, amiknek a betegségekben betöltött szerepe kettős: működési zavaruk a betegségek kialakulását elősegítheti és lefolyását súlyosbíthatja, másrészt az epitelsejtek fizikai védelmi rendszerei gátolhatják a gyógyszerek felszívódását és bejutását az egyes szervekbe. A tüdőben és az emésztőrendszerben a fizikai gátat a sejtek közötti szoros kapcsoló fehérjék hozzák létre, megakadályozzák különböző anyagok sejtek közötti átjutását. További fizikai védelmi rendszernek tekinthető a tüdő és a belek felszínét borító nyák, amely számos betegségben érintett, például a cisztás fibrózisban. A betegségek kezelésében fontos szerepet játszanak a kiegészítő terápiák, amik segíthetik a betegség tüneteinek mérséklését, más esetben a gátrendszerek reverzibilis megnyitásával fokozhatják a hatóanyagok célbajutását. Azonban ezeknek az adjuváns szereknek a vizsgálatához olyan modell rendszerek szükségesek, amelyek megfelelően tükrözik a szervezetben található adott szerv komplexitását.

A cisztás fibrózis egy genetikai betegség, amelynek hátterében a cisztás fibrózis transzmembrán regulátor (CFTR) csatornát kódoló gén mutációja áll. A CFTR egy cAMP aktivált anion csatorna, ami a klorid és bikarbonát ionok transzportjáért felelős. Működőképes CFTR csatorna hiányában csökken az ionok szekréciója, fokozódik a  $\text{Na}^+$  és a víz visszaszívás, ami a sejtek felszínét borító nyák besűrűsödéséhez és elsavasodásához vezet (1.ábra). Ez a légzési nehézségek mellett, ideális környezetet biztosít a patogének elszaporodásához, ami folyamatos gyulladáshoz vezet a betegek tüdejében.

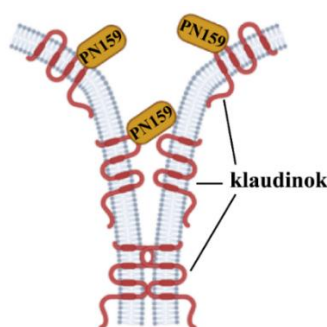


1. ábra. A CFTR csatorna egészséges és cisztás fibrózisban állapottban.

A nátrium bikarbonát ígéretes szer lehet kiegészítő terápiákban. Jótékony hatását figyelték meg, elsősorban mint nyákoldó, különböző légúti megbetegedésekben, ezen kívül bakteriosztatikus hatását is leírták a cisztás fibrózisban leggyakrabban előforduló patogén, a *Pseudomonas aeruginosa* esetében. A közelmúltban cisztás fibrózisban betegekben végzett

klinikai vizsgálatban a nátrium bikarbonát csökkentette a nyák sűrűségét és megnövelte a légúti folyadék pH értékét. A nátrium bikarbonát közvetlen hatását légúti epitelsejteken azonban eddig még nem vizsgálták.

A gátrendszer szorosságát az epitelsejtek membránjában található kapcsoló fehérjék (szoros kapcsolatok) határozzák meg. Ezek a struktúrák lezárják a sejtek közötti, úgynevezett paracelluláris utat, ezáltal gátolják ionok, molekulák és sejtek, továbbá egyes hatóanyagok átjutását a gátrendszeren. Utóbbi a betegségek kezelésében jelent problémát. Azonban a sejtek közötti kapcsolatok reverzibilis megnyitásával fokozni lehet a gyógyszerek bejutását az egyes szervekbe. A szintetikus PN159 peptidet, mint antimikrobiális hatású, amfipatikus sejtpenetráló peptidet (CPP) írták le először.



**2. ábra.** A PN159 peptid kapcsolódik a klaudin fehérjék extracelluláris doménjéhez, ezáltal megnyitja a paracelluláris útvonalat.

Később kimutatták szoros kapcsolatokat módosító hatását légúti tenyészetes modellen, ahol hatásosan növelte a sejtréteg áteresztőképességét (2. ábra). A peptid  $\alpha$ -helikális másodlagos fehérjeszerkezete és amfipatikus tulajdonságai miatt erős kölcsönhatásba lép a biológiai membránokkal, ezért ígéretes alternatíva lehet a multidrog rezisztens baktériumtörzsek kezelésében.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Számos jótékony hatása ellenére a nátrium bikarbonát közvetlen hatását bronchiális epitelsejteken még nem vizsgálták. Célunk ezért az volt, hogy (i) létrehozzunk a cisztás fibrózis tanulmányozására szolgáló ko-kultúra modellt, (ii) megvizsgáljuk különböző tenyésztési körülmények és (iii) a nátrium bikarbonát hatását ezeken a sejteken. Vizsgálataink másik fő anyaga a kettős hatással rendelkező PN159 peptid volt. Célunk volt, egyrészt a peptid sejtközi kapcsolatokat módosító hatásának vizsgálata (iv) a hörgő- és bélhám tenyészeteken, másrészt membrán permeabilizáló hatásának vizsgálata (v) a bélhám tenyészetes modelljén és (vi) antibiotikum rezisztens ESKAPE patogéneken.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

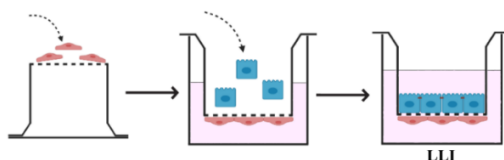
#### 3.1. Sejttenyésztés

##### 3.1.1. A humán cisztás fibrózis bronchiális tüdőepítél sejtvonalak tenyésztése

A CFBE41o- sejtvonalat vad típusú CFTR csatornát (WT-CFTR) és a leggyakoribb CFTR csatorna mutációt ( $\Delta F508$ -CFTR) hordozó plazmiddal transzfektálták. A CFBE sejteket 10% borjúsavóval (FBS, Pan-Biotech GmbH, Németország), glutaminnal (Glutamax, 2 mM) és gentamicinnel (50  $\mu\text{g/ml}$ ) kiegészített Minimum Eagle Medium (MEM) tápfolyadékban tenyésztettük inkubátorban 37 °C-on, 5%  $\text{CO}_2$ -tartalom mellett. A sejteket növesztés során puromicin (2  $\mu\text{g/ml}$ ) szelekció alatt tartottuk. A tenyésztő felszíneket kollagénnel vontuk be. A permeabilitási kísérletekhez a tüdő epítélsejteket 12-lyukú tenyésztőedényekbe helyezett sejttenyésztő betéteken növesztettük (Transwell, 0,4  $\mu\text{m}$  pórusméret, 1,1  $\text{cm}^2$  membránfelszín, Corning Costar Co., USA). Az epítélsejteket 10 napig növesztettük monokultúrában, vagy az endotélsejtekkel ko-kultúrában.

##### 3.1.2. A humán endotélsejtek tenyésztése

A ko-kultúra létrehozásához humán hematopoetikus őssejtekből származó endotélsejteket használtunk. A sejteket 5% borjúsavóval, 1% endoteliális növekedési faktoral (ECGS, Sciencell) és 0,5% gentamicinnel kiegészített endotélsejt médiumban (ECM-NG, Sciencell, Carlsbad, USA) tenyésztettük. A ko-kultúra modell összeállítását a 3. ábra szemlélteti.



**3. ábra.** A humán bronchiális epítélsejt és endotélsejt ko-kultúra modell összeállítása.

Először az endotélsejteket szélesztettük a sejttenyésztő betét membránjának alsó felszínére, majd a sejteket 3 órán át inkubátorban tartottuk. A sejtek letapadását követően a sejttenyésztő betéteket a 1,5 ml endotél médiumot tartalmazó 12-lyukú tenyésztőedényekbe helyeztük, majd a tüdőepítél-sejteket a membrán felső felszínére pipettáztuk.

##### 3.1.3. A humán Caco-2 bélepitél-sejtvonala tenyésztése

A humán Caco-2 bélhám eredetű adenokarcinóma sejtvonala az ATCC cégtől szereztük be (katalógus szám: HTB-37). A sejteket 10% borjúsavóval (Gibco, Life Technologies,

Carlsbad, USA) és 0,5% gentamicinnel kiegészített DMEM/HAM F-12 (Gibco, Life Technologies) médiumban tenyésztettük inkubátorban 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett.

### **3.2. Vizsgálati módszerek és kezelések**

#### **3.2.1. A CFBE sejtek kezelése**

A CFTR csatorna-aktivátor cAMP törzsoldatát a kezelőoldatokhoz 250 µM koncentrációra hígítottuk. A cAMP lebomlásának elkerülése érdekében cAMP-specifikus foszfodiészteráz 4 inhibitor (RO 201724, 17,5 µM) adtunk a kezelési oldathoz. A CFTR inhibitor CFTR<sub>inh</sub>-172 törzsoldatát a kezeléshez tápfolyadékban 10 µM-os koncentrációra hígítottuk. A betegek tüdejét jellemző gyulladás modellezésére a sejteket TNF-α (50 ng/ml) és IL-1β (25 ng/ml) citokin kombinációjával kezeltük a sejtenyésző betét mindkét oldalán. A kezelések után a sejtrétegek integritását elektromos ellenállás és permeabilitás mérésekkel vizsgáltuk meg. A nátrium bikarbonát (NaHCO<sub>3</sub>) hatásának tesztelésére először 500 mM-os törzsoldat készítettünk. A kezelési oldatokat elkészítéskor figyelembe vettük, hogy a MEM tápfolyadék már önmagában is 26 mM NaHCO<sub>3</sub>-ot tartalmaz.

#### **3.2.2. A CFBE sejtek életképességének vizsgálata valósídejű sejtanalízissel**

A sejtenyészetek biológiai állapotának jelzőanyag nélküli, valósídejű nyomonkövetésére impedancia mérést használtunk (RTCA-SP, ACEA Biosciences, USA). A CFBE sejteket egy 96-lyukú lemezen (E-plate, ACEA Biosciences) tenyésztettük, aminek az alján impedancia mérésre alkalmas arany mikroelektrodák találhatók. A sejtek növekedésével arányosan emelkedik a mért impedancia, amit a sejtindex (CI) értékével fejezünk ki. A sejtindexet a rendszer programja számolja ki az  $(R_n - R_b)/15$  képlet segítségével, ahol  $R_n$  a sejtek és az elektród között mért impedancia, az  $R_b$  pedig a háttér impedancia. A háttér impedancia meghatározásához 50 µl sejtmentes tápfolyadékot pipettáztunk a lyukakba. Ezt követően 50 µl sejtszuspenziót mértünk a lemez lyukaiba. A készülék mérőegységét az E-plate-tel együtt az inkubátorba helyeztük. Az epitelsejteket addig tenyésztettük, amíg a sejtek teljesen benőtték a lyukak felszínét (platófázis). Az impedancia értékeket a kezelés előtti utolsó időpont értékeihez normalizáltuk, így határoztuk meg a NaHCO<sub>3</sub> sejtekre kifejtett hatását, amit az idő függvényében ábrázoltunk.

#### **3.2.3. A CFBE sejtrétegek gátműködésének vizsgálata**

A tenyészetekben mért transzepteliális elektromos ellenállás (TEER) értéke a sejtek közötti szoros kapcsolatok ionokkal szembeni áteresztőképességét mutatja. A humán CFBE

sejtvonalak sejtrétegeinek ellenállásértékeit EVOM rezisztencia-mérővel és STX-2 elektródákkal (World Precision Instruments, USA) mértük a tápfolyadék cseréje előtt minden második nap. A TEER értékekből levontuk a sejtek nélküli tenyésztő betéteken mért ellenállásértékek átlagát, majd a tenyésztőmembrán felszínéhez viszonyítva ( $\Omega \times \text{cm}^2$ ) átlagoltuk a TEER értékeket. Az ellenállásmérést a kísérletek előtt és közvetlenül utána is elvégeztük.

A sejtréteg szorosságának meghatározásához nátrium fluoreszcint (SF; 376 Da) és Evans-kék festékkel jelölt szérum albumint (EBA; 67 kDa) használtunk. A kezelés után a tenyésztőbetéteket 12-lyukú tenyésztő-lemezekbe helyeztük, amely lyukanként 1,5 ml Ringer-Hepes oldatot tartalmazott. A felső folyadéktérbe 500  $\mu\text{l}$  Ringer-Hepes oldatot pipettáztunk, amely SF (10  $\mu\text{g/ml}$ ) és EBA (1 mg/ml BSA + 167,5  $\mu\text{g/ml}$  Evans-kék) jelzőanyagokat tartalmazott. A tenyésztőedényeket inkubátorban síkrázó készüléken (120 fordulat/perc; OS10 síkrázó, BioSan, Lettország) tartottuk. Az átjutott jelzőanyag mennyiségét az alsó kompartmentből összegyűjtött mintákból többlyukú lemezleolvasóval (BMG Fluostar Optima, BMG Labtech, Németország) határoztuk meg. A kapott eredményeket a látszólagos permeabilitási együttható ( $P_{\text{app}}$ ) segítségével határoztuk meg.

### **3.3. A sejtek intracelluláris pH értékének meghatározása**

A CFBE sejtek belső nyugalmi pH-jának ( $\text{pH}_i$ ) meghatározásához a sejteket üveg fedőlemezekon növesztettük. A  $\text{NaHCO}_3$  hatásának vizsgálatához a CFBE sejteket inkubátorban 100 mM bikarbonát tartalmú tápfolyadékkal kezeltük egy órán át. Mosást követően pH-érzékeny fluoreszcens festékkel (BCECF-AM; 2  $\mu\text{M}$ ; Biotium Inc., USA) töltöttük fel a CFBE sejteket HEPES-puffer oldatban ( $\text{pH} = 7,4$ ). Ezután a sejteket nedves kamrában 37 °C-on 25 percig inkubáltuk. Az üveg fedőlemezeket a sejtekkel behelyeztük egy fluoreszcens mikroszkópra (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Németország) szerelt perfúziós kamrába (QE-1, Warner Instruments, USA). A sejteket 495 nm és 436 nm hullámhosszon fénnel gerjesztettük, és a 495/436 fluoreszcencia kibocsátási arányt 540 nm hullámhosszon mértük. A mikroszkóp által készített felvételeken sejteket jelöltünk ki, ahol a fluoreszcencia intenzitásokat ZEN szoftver (Carl Zeiss Microscopy GmbH) segítségével mértük. A mérés során a 495 és 436 nm-nél gerjesztett festék emissziós értékek hányadosait rögzítettük. A sejtek nyugalmi pH értékének meghatározásához először rögzítettük az inkubáló oldatban a már fent említett arányszámot, majd ezeket az értékeket szintén mértük, amikor nigericin nátrium sóval (10  $\mu\text{M}$ ; Tocris Bioscience, UK) kiegészített különböző pH-jú, kalibrációs puffert áramoltattunk a sejteken. A nigericin által a sejtek belső pH-ja megegyezik az oldat pH-jával,

és ezen adatokból egy kalibrációs egyenes készíthető, amelynek segítségével a sejtek nyugalmi állapotában mért arányszámából  $pH_i$  kiszámolható.

### **3.4. Az epitelsejt modellek kezelése PN159 peptiddel**

#### **3.4.1. A humán cisztás fibrózis bronchiális epitelsejtek kezelése**

A PN159/KLAL peptid permeabilitást fokozó hatását a CFBE sejtvonalakon is megmértük. A peptid törzsoldatát a kezelésekhöz tápfolyadékban hígítottuk  $10\ \mu\text{M}$  koncentrációra. A CFBE monokultúrát 30 percig kezeltük a peptiddel. A kezelőoldat eltávolítása után két időpontban mértük a TEER és a permeabilitás értékeit: rögtön a peptidhatás után, valamint 24 órával később, a sejtrétegek helyreállási időszakának végén.

#### **3.4.2. A humán Caco-2 bél epitelsejtek kezelése: a klaudin-4 fehérje és a peptid kolokalizációja**

A klaudin-4 sejtkapcsoló fehérje és a peptid kolokalizációjának vizsgálatához a sejteket Bodipy FL maleimiddel jelölt PN159 peptiddel ( $10\ \mu\text{M}$ ) kezeltük 5 percig. A klaudin-4 és magfestést követően a mintákról konfokális mikroszkóp segítségével képeket készítettünk.

### **3.5. A PN159 peptid antimikrobiális hatásának meghatározása**

A PN159 peptid antimikrobiális aktivitás spektrumát öt ESKAPE kórokozón vizsgáltuk. A PN159 peptid minimum gátló koncentráció (MIC) értékét az ESKAPE kórokozó törzsnél Mueller-Hinton táptalajban határoztuk meg. Az *Enterococcus faecium* esetében agy és szív kivonatot tartalmazó táptalajt használtunk. A MIC értékeket az általános sorozathígítási technika alkalmazásával határoztuk meg. A sejtnövekedést az optikai sűrűség méréseivel követtük nyomon (OD600, Synergy 2 mikrolemez-leolvasó BioTek Instruments Inc., USA). A MIC értékeket a teljes növekedésgátlásként határoztuk meg ( $\text{OD}_{600} < 0,05$ ). Referenciavegyületekként három különböző baktericid szer antimikrobiális hatását teszteltük, a cefoxitint ( $100\ \mu\text{g/ml}$ ), gentamicint ( $100\ \mu\text{g/ml}$ ) és ciprofloxacint ( $10\ \mu\text{g/ml}$ ).

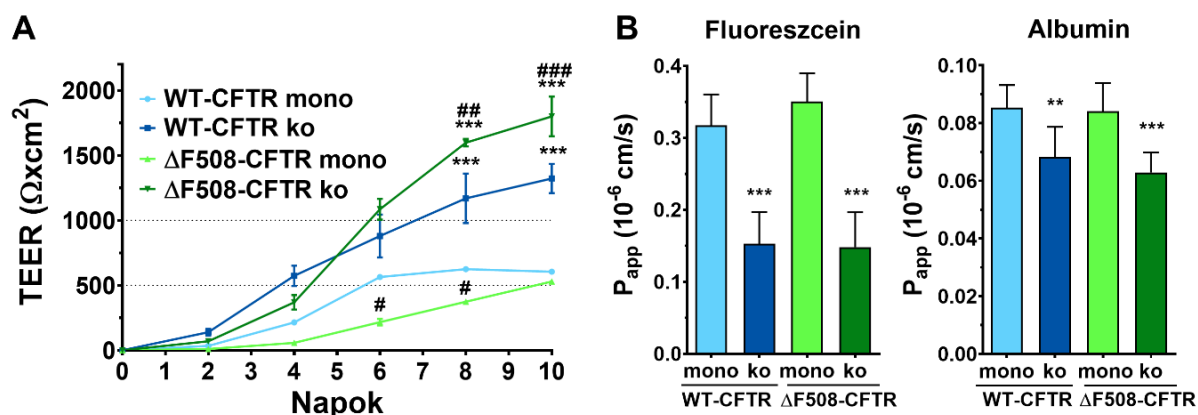
## **4. Statisztikai kiértékelés**

Az adatok statisztikai kiértékeléséhez a GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA) programot használtuk. A kísérletekben kapott adatokat átlag  $\pm$  SD formában adtuk meg. A kezelési csoportok közötti különbségeket kétutas ANOVA-t követően Bonferroni-teszttel elemeztük. Statisztikailag szignifikánsnak a  $P < 0,05$  értékeket tekintettük. A kísérleteket legalább háromszor megismételtük, és kísérletenként legalább három párhuzamos mintát használtunk.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A CFBE sejtek gátműködésének jellemzése mono- és ko-kultúrában: transzepiteliális elektromos ellenállás és permeabilitási vizsgálatok

A CFBE sejtvonalak szoros sejtréteget hoztak létre mindkét modell esetén a tizedik napra. A humán vaszkuláris endotélsejtek jelenléte tovább fokozta a tüdő epitélisejtek biológiai gát tulajdonságait, ahogy azt a magas ellenállási értékek is jól mutatnak.



**4. ábra.** A mono- és ko-kultúrában növesztett tisztás fibrózis bronchiális epitélisejtek (CFBE) transzepiteliális elektromos ellenállás (A) és permeabilitási értékei (B). Az értékeket átlag  $\pm$  SD-ként ábrázoltuk,  $n = 4$ /csoport. Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  a monokultúrához hasonlítva; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  az adott vad típusú csoporthoz hasonlítva.

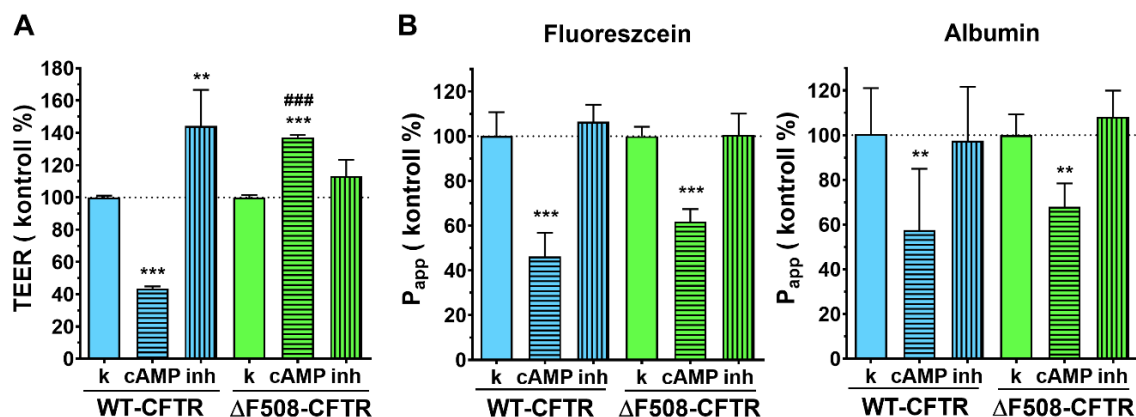
Az endotélsejtekkel való együtt tenyésztés alacsonyabb permeabilitási értékeket eredményezett (4B ábra), mind a kis molekulású fluoreszcein, mind a nagyobb molekulású albumin jelzőmolekulák esetében. Ezeket az eredményeket a ZO-1 és E-kadherin sejtkapcsoló fehérjék immunfestése és azok analízise is megerősítette.

### 4.2. A CFTR csatorna aktiválásának és gátlásának vizsgálata a CFBE sejtpáron: ellenállási és permeabilitási mérések

A CFTR anion csatorna aktivációja a sejtekbe bejutó cAMP analóggal a vad típusú sejtek esetében csökkent ellenállási értékeket eredményezett (5A ábra). A WT-CFTR CFBE sejtréteg ellenállás értékeinek csökkenése azonban nem járt együtt a jelzőanyagok fokozott átjutásával. Ebből arra következtethetünk, hogy a vad típusú sejteknél tapasztalt csökkent TEER értékek a cAMP által aktivált CFTR csatornán keresztüli megnövekedett ionáramlást mutatják. A ΔF508-CFTR CFBE sejtek magasabb TEER és csökkent permeabilitási értékeket mutattak (5. ábra). Ez a sejtréteg szorosságának fokozódását tükrözi, ami a cAMP közismert barrier erősítő



hatásának köszönhető. A csatorna aktivációra jellemző TEER csökkenés nem volt megfigyelhető (5A ábra).

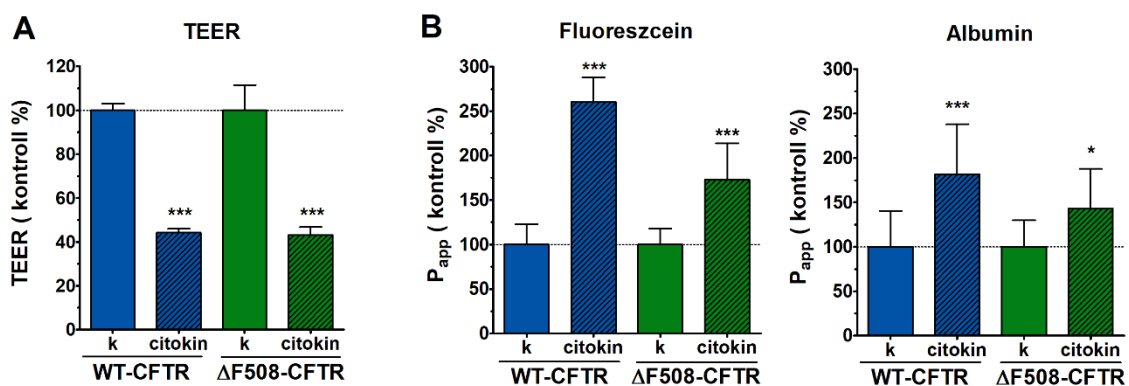


**5. ábra.** A cAMP analóg (250  $\mu$ M) és a CFTR csatorna gátló CFTR<sub>inh</sub>-172 (inh; 10  $\mu$ M) 1 órás kezelés hatása a sejtréteg elektromos ellenállására (A) és permeabilitására (B). Az értékeket a kontroll csoport százalékában ábrázoltuk (átlag  $\pm$  SD,  $n = 4$ /csoport). Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  a kontroll csoporthoz hasonlítva, ###  $p < 0,001$  az adott vad típusú csoporthoz hasonlítva.

A CFTR inhibitor kezelés a WT-CFTR bronchiális epitelsejteken a TEER értékekre az aktivátorral ellentétes hatást váltott ki (5A ábra). Ezzel szemben a mutáns CFTR csatornát kifejező epitelsejtek ellenállás értékei nem változtak, ami további bizonyíték arra, hogy a CFTR csatorna ezekben a sejtekben nem funkcionális.

#### 4.3. Citokinek hatása a CFBE ko-kultúra gátműködésére

A cisztás fibrózisban megfigyelhető gyulladás modellezésére a CFBE sejteket TNF $\alpha$  és IL-1 $\beta$  citokinek kombinációjával kezeltük meg. A ko-kultúrában tenyésztett CFBE sejtvonalak esetén erősen károsodott a sejtréteg a citokin kezelés hatására.



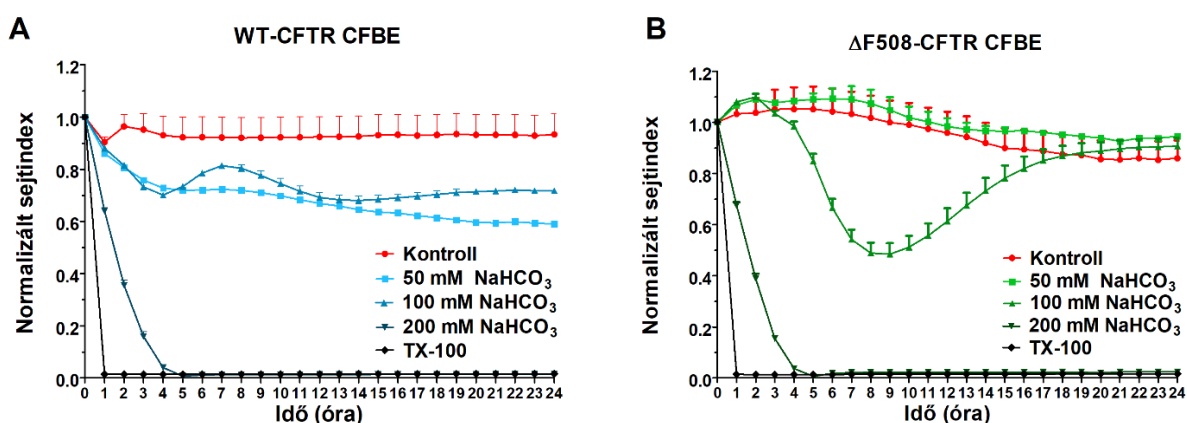
**6. ábra.** A CFBE ko-kultúrák transzepteliális elektromos ellenállása (A) és permeabilitási értékei (B) 6 órás citokin kezelés után. Az értékeket a kontroll csoport százalékában ábrázoltuk (átlag  $\pm$  SD,  $n = 4$ /csoport). Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  a kontroll csoporthoz hasonlítva.

A TEER értékek a kontroll csoport értékeinek felére csökkentek (**6A ábra**). Ezzel egyidőben a különböző jelzőanyagok permeabilitási értékei a kontroll csoportéhoz képest a többszörösükre nőttek (**6B ábra**). A citokinek hatása a vaszkuláris endotélsejtek jelenlétében erőteljesebb volt, mint a monokultúrákban, ahol a barrier funkció alig változott. Eredményeink arra utalnak, hogy a CFBE ko-kultúra modellek erőteljesebben reagálnak a citokin kezelésre, emiatt alkalmasabb modellek lehetnek a gyulladásos állapotok *in vitro* vizsgálatához, mint a monokultúrák.

#### 4.4. A nátrium bikarbonát hatása a cisztás fibrózis bronchiális epitélsejt tenyészeteken

##### 4.4.1. Életképességi vizsgálatok: valósídejű sejtanalízis

A nátrium bikarbonát idő és koncentrációfüggő hatást mutatott a CFBE sejtek életképességére a valósídejű sejtanalízis mérések alapján (**7. ábra**). Az 50 és 100 mM nátrium bikarbonát koncentrációk megváltoztatták a WT-CFTR CFBE sejtek életképességét a kezelés első órája után (**7. ábra**), ami a nátrium bikarbonáttal szembeni fokozott érzékenységet mutatja.

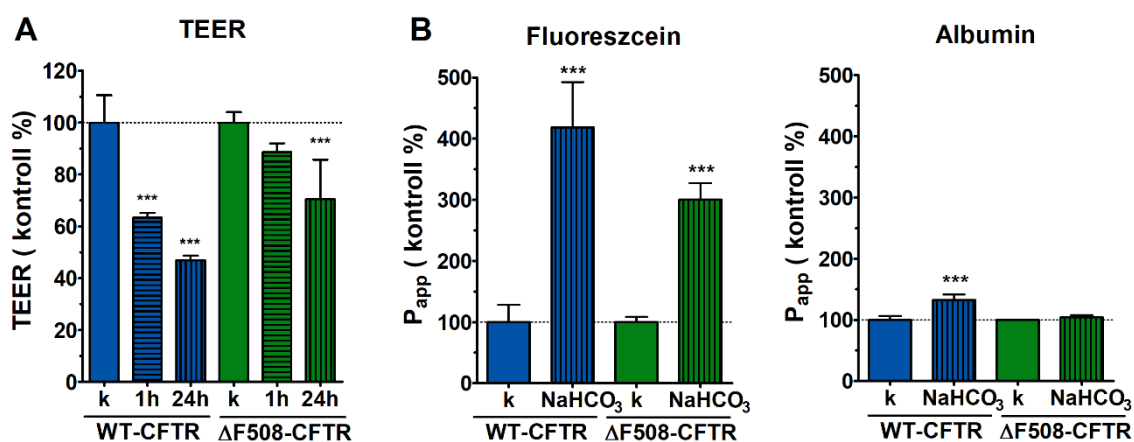


**7. ábra.** A WT-CFTR CFBE (A) és a  $\Delta F508$ -CFTR CFBE (B) sejtek valósídejű impedancia mérése különböző koncentrációjú (50, 100, 200 mM) NaHCO<sub>3</sub> kezelés hatására. A nátrium bikarbonát hatását az impedancia értékekre normalizált sejtinдексként ábrázoltuk (átlag  $\pm$  SD,  $n = 11-13$ /csoport).

Ezzel ellentétben, a mutáns CFTR csatornát kifejező sejteknél az 50 mM-os koncentráció nem változtatta meg a sejtek impedanciáját, míg a 100 mM koncentráció esetén egy átmeneti csökkenés után a kontroll szintjére állt vissza (**7A ábra**). A legmagasabb, 200 mM nátrium bikarbonát koncentráció mindkét sejtvonalnál a sejtek pusztulását idézte elő. Az életképességi vizsgálat alapján a 100 mM NaHCO<sub>3</sub> koncentrációt választottuk a további kísérletekhez.

#### 4.4.2. A nátrium bikarbonát hatása a CFBE sejtek gátműködésére: transzepiteliális elektromos ellenállás és permeabilitás vizsgálat

A  $\text{NaHCO}_3$  CFBE sejtek barrier integritására kifejtett hatásának tanulmányozására a mono- és ko-kultúrákat 100 mM nátrium bikarbonátot tartalmazó tápoldattal kezeltük 24 órán keresztül. A TEER értékeket az 1 órás kezelési időpontban is lemértük. A ko-kultúrák közül a WT-CFTR CFBE sejtek sokkal érzékenyebben reagáltak a nátrium bikarbonát kezelésre mindkét kezelési időpontban, ahogy azt az alacsonyabb TEER értékek is mutatnak (**8A ábra**). Ezzel összhangban a vad típusú sejtekben a kontroll csoporthoz képest megnőtt mindkét jelzőmolekula átjutása a sejtrétegeken (**8B ábra**).

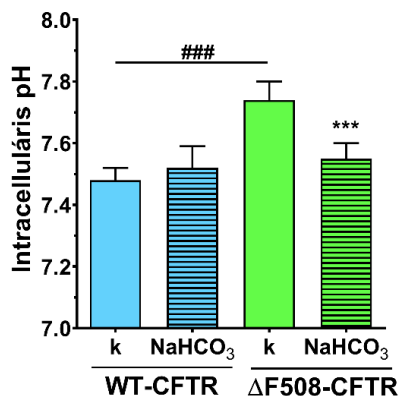


**8. ábra.** A 100 mM  $\text{NaHCO}_3$  hatása a ko-kultúrában növesztett CFBE sejtek barrier integritására. A transzepiteliális elektromos ellenállás értékek a kezelés első és 24. órájában (A), valamint a permeabilitási értékek (B) a 24 órás kezelést követően. Az értékeket a kontroll csoport százalékában ábrázoltuk (átlag  $\pm$  SD,  $n = 4$ /csoport). Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  a kontroll csoporthoz hasonlítva.

A  $\Delta\text{F508-CFTR}$  CFBE ko-kultúra esetében a 100 mM  $\text{NaHCO}_3$  kezelés nem változtatta meg a sejtrétegek ellenállását egy órás kezelésnél. A TEER értékek csak 24 órás kezelés után csökkentek (**8A ábra**), ezzel párhuzamosan a fluoreszcein magasabb átjutását mértük a kontrollhoz képest. Az albumin átjutása változatlan maradt (**8B ábra**), ami a továbbra is zárt gátműködést mutatja.

#### 4.4.3. A bikarbonát hatása a CFBE sejtek nyugalmi intracelluláris pH értékére

A mutáns CFTR csatornát kifejező CFBE sejtek esetén megemelkedett intracelluláris pH-t mértünk ( $7,74 \pm 0,06$ ), ami az egy órás 100 mM  $\text{NaHCO}_3$  kezelés hatására a vad típusú sejtek pH értékére csökkent (**9. ábra**).



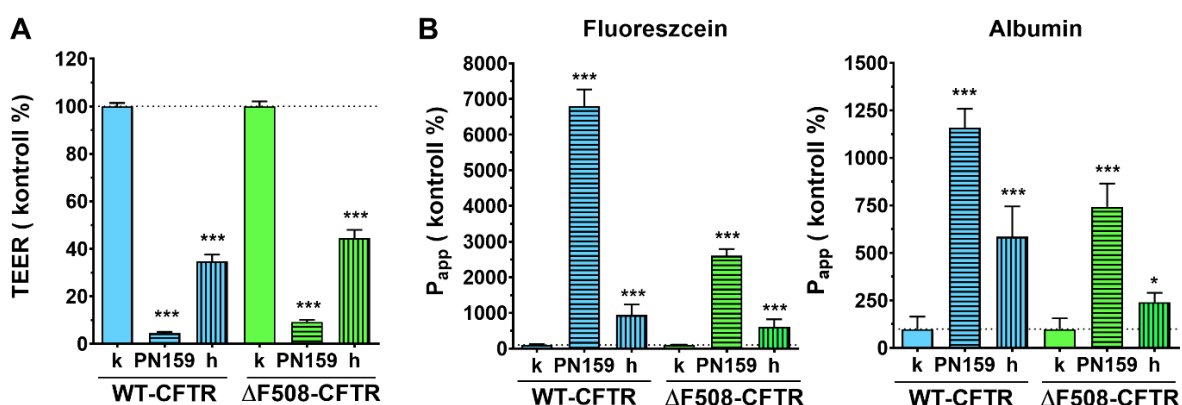
**9. ábra.** A nátrium bikarbonát (100 mM, 1 óra) kezelés hatása a CFBE sejtek intracelluláris pH értékére. Átlag  $\pm$  SD,  $n = 47-67$ /csoport. Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. ###  $p < 0,001$  a vad típusú epitelsejtekhez hasonlítva, \*\*\*  $p < 0,001$  a kontroll csoporthoz hasonlítva.

Az intracelluláris pH mérés eredményei alapján a 100 mM nátrium bikarbonát kezelés közvetlen jótékony hatását tudtuk kimutatni a mutáns CFTR csatornát kifejező hörgőhám sejtek esetében.

#### 4.5. A PN159 peptid hatása különböző epitelsejtes gátmodelleken

##### 4.5.1. A PN159 peptid hatása CFBE sejtrétegekre: elektromos ellenállás és permeabilitás

A PN159 peptid permeabilitást fokozó hatását a CFBE sejtvonalon is megvizsgáltuk. A peptid kezelés hatására a CFBE sejtek TEER értékei a kontroll csoportok 10%-ára csökkentek le (10A ábra).



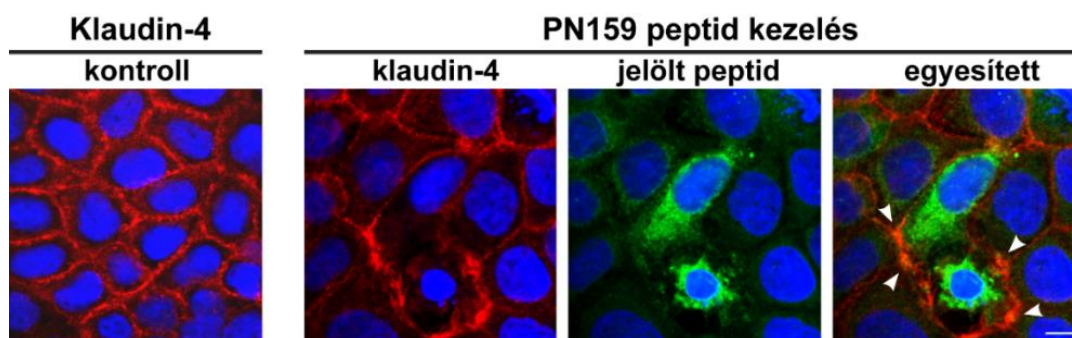
**10. ábra.** A CFBE sejtréteg TEER (A) és permeabilitási (B) értékei PN159 peptid kezelést (10  $\mu$ M, 30 perc) követően, majd a peptid eltávolítása és a sejtréteg helyreállása (h) után (24 óra). Az értékeket a kontroll csoport százalékában ábrázoltuk (átlag  $\pm$  SD,  $n = 4$ /csoport). Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  a kontroll csoporthoz (k) hasonlítva.

Ezzel párhuzamosan, a különböző jelzőanyagok átjutása a sejtrétegen sokszorosára nőtt, ami a barrier teljes megnyílását jelzi (10B ábra). A peptid eltávolítása és a sejtrétegek

helyreállása után (24 óra) a TEER értékek növekedtek, de a kontroll csoportok szintjét nem érték el (**10A ábra**). A peptid eltávolítását követően 24 órával a permeabilitási adatok az alapértékek közelébe tértek vissza, azonban ezek az értékek magasabbak a nem kezelt csoportokénál, az alacsonyabb TEER értékekkel összhangban (**10B ábra**).

#### 4.5.2. A PN159 peptid és a klaudin-4 fehérje kolokalizációjának vizsgálata

Kutatócsoportunk a PN159 peptid szerkezeti modellezésének segítségével energetikailag kedvező kapcsolatot mutatott ki a klaudin-4 epiteliális sejtkapcsoló fehérje és a peptid között. Ezt az eredményt az immunhisztokémiai festéssel is igazolni tudtuk.



**11. ábra.** A Bodipy FL jelölt PN159 peptiddel (10  $\mu$ M) kezelt Caco-2 sejtek immunfestése klaudin-4 sejtkapcsoló fehérjére. Piros: klaudin-4. Zöld: Bodipy FL jelölt PN159 peptid. Kék: sejtmag. Mércé: 10  $\mu$ m. Nyíl: klaudin-4 és a jelölt peptid kolokalizációja.

A jelölt PN159 peptid a citoplazmán kívül a sejtmembránban is detektálható volt, és a felszakadozott klaudin-4 festéssel kolokalizációt mutatott (**11. ábra**).

#### 4.6. A PN159 peptid antimikrobiális hatása

Ismert sejtpenetráló hatása miatt a PN159 peptid antimikrobiális hatását először teszteltük hat ESKAPE patogén baktériumon, széles koncentráció tartományban (0,8-70  $\mu$ M). A vizsgált baktériumok közül, az *Acinetobacter baumannii* és az *Enterococcus faecium* volt a két legérzékenyebb törzs, 5  $\mu$ M alatti MIC értékekkel. A *Staphylococcus aureus* és a *Klebsiella pneumoniae* esetén 10  $\mu$ M körül volt a PN159 növekedésgátló koncentrációja, amely a humán epitelsejtekre is hatással volt már. A gentamicin és ciprofloxacin erős antimikrobiális hatást mutatott az összes ESKAPE patogénre nézve, kivéve az *Enterococcus faecium* esetén, amely az összes vizsgált antibiotikumra rezisztens volt, azonban a PN159 peptid gátolni tudta a növekedését.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Sok betegség kezelésében játszanak fontos szerepet a kiegészítő terápiák, ezért a lehetséges adjuváns szerek és eljárások felkutatására nagy igény van. Ezek a szerek segíthetik a betegség tüneteinek mérséklését, más esetben a gátrendszerek reverzibilis megnyitásával fokozhatják a hatóanyagok célba jutását és hatását. Vizsgálataink során a nátrium bikarbonátot, a cisztás fibrózis betegség lehetséges kiegészítő terápiás szerét, valamint a PN159/KLAL kettős hatású peptidet vizsgáltuk a humán epitelsejtes gátrendszerek tenyészetes modelljein. A nátrium bikarbonát jótékony hatását klinikai és *in vitro* kísérletek is bizonyítják, azonban közvetlen hatását légúti epitelsejteken eddig még nem vizsgálták. Első lépésként megfelelő tenyészetes modellre van szükség. Hogy a modell még közelebb álljon az *in vivo* rendszerek összetettségéhez, elengedhetetlen többféle sejt együttes tenyésztése. Elsőként hoztunk létre és jellemeztünk egy, a cisztás fibrózis vizsgálatára alkalmas ko-kultúra modellt bronchiális epitelsejtvonalak és humán endotelsejtek együtt tenyésztésével. Kísérleteink során olyan cisztás fibrózis bronchiális epitél (CFBE) sejtvonalakat használtunk, amelyeket egészséges CFTR csatornát, illetve  $\Delta F508$  mutáns CFTR csatornát hordozó plazmiddal transzfektáltak. A sejteket önmagukban (monokultúra), vagy humán endotelsejtekkel együtt (ko-kultúra) tenyésztettük. Az endotelsejtek jelenlétében a bronchiális epitelsejtek szorosabb sejtréteget hoztak létre. A sejtközzötti kapcsolatok megerősödését igazoltuk az immunfestődési mintázat intenzitásának analízise alapján. A CFTR csatorna működését módosító kezelések eredményei alapján igazoltuk a modellek megbízhatóságát és alátámasztottuk a vad típusú sejtekben a működőképes CFTR csatorna jelenlétét, míg a mutáns sejteknél annak hiányát. A cisztás fibrózisos betegek légzőrendszerét jellemző krónikus gyulladás modellezéséhez citokinekkal kezeltük meg a tenyészeteket. Csak a ko-kultúrák esetén kaptunk szignifikáns választ a citokin kezelésre, amely eredmény arra utal, hogy a ko-kultúra modellek alkalmasabbak lehetnek a gyulladásos állapotok *in vitro* vizsgálatára. Elsőként vizsgáltuk a nátrium bikarbonát különböző koncentrációinak közvetlen hatását a bronchiális epitelsejtekre. A CFBE sejtvonalpár eltérő választ adott a nátrium bikarbonát kezelésre. Az életképességi és a sejtréteg integritási vizsgálatok alapján a vad típusú CFTR csatornát kifejező sejtek érzékenyebbek bizonyultak, míg a mutáns sejtek esetén a  $\text{NaHCO}_3$  előnyös hatását tudtuk kimutatni. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a legmagasabb, de még biztonságosan alkalmazható nátrium bikarbonát koncentráció 100 mM-os volt. A  $\text{NaHCO}_3$  kezelés hatására a mutáns CFBE sejtek magasabb intracelluláris pH értéke lecsökkent, megközelítve a vad típusú sejteken mért értéket.

A PN159 peptid kettős hatással rendelkezik: mind sejtpenetráló, mind sejtközzötti szoros kapcsolatokat megnyitó tulajdonsága ismert. Kísérleteink során igazoltuk a PN159 peptid szoros

sejtközi kapcsolatokat megnyitó hatását a humán bronchiális epitelsejt modellen. A Caco-2 sejteken igazoltuk a peptid membrán-penetráló hatását, mivel a jelzett peptid koncentrációfüggő módon bejutott az élő sejtekbe. Bizonyítottuk a peptid kolokalizációját a kladin-4 sejtkapcsoló fehérjével. Munkánk során kimutattuk a PN159 peptid antimikrobiális hatását klinikailag releváns ESKAPE patogének esetén. A referencia antibiotikumokkal összehasonlítva a PN159 peptid hatékonyabbnak bizonyult a *Pseudomonas aeruginosa* baktériumtörzs növekedésének gátlásában, ami a krónikus légúti fertőzés és gyulladás okozta nagyszámú elhalálozásért felelős, cisztás fibrózis betegekben.

Eredményeink is alátámasztják, hogy a nátrium bikarbonát, mint adjuváns szer, biztonságosan alkalmazható a cisztás fibrózis kezelésében és segíthet a tüdőt érintő tünetek mérséklésében. A PN159 peptid hatásosan nyitja az epitelsejtek közötti kapcsolatokat, így alkalmas jelölt lehet gyógyszerhatóanyagok átjuttatására biológiai gátrendszereken, továbbá antimikrobiális hatásának köszönhetően ígéretes jelölt lehet a multidrog rezisztens baktériumtörzsek kezelésében.

## 6. A DOKTORI ÉRTKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

- I. Bocsik A, **Gróf I**, Kiss L, Ötvös F, Zsíros O, Daruka L, Fülöp L, Vastag M, Kittel Á, Imre N, Martinek TA, Pál C, Szabó-Révész P, Deli MA.  
Dual action of the PN159/KLAL/MAP peptide: increase of drug penetration across Caco-2 intestinal barrier model by modulation of tight junctions and plasma membrane permeability.  
*Pharmaceutics*. 11(2). pii: E73. (2019)  
IF: 4,773
- II. **Gróf I**, Bocsik A, Harazin A, Santa-Maria AR, Vizsnyiczai G, Barna L, Kiss L, Für G, Rakonczay Z Jr, Ambrus R, Szabó-Révész P, Gosselet F, Jaikumpun P, Szabó H, Zsembery Á, Deli MA.  
The effect of sodium bicarbonate, a beneficial adjuvant molecule in cystic fibrosis, on bronchial epithelial cells expressing a wild-type or mutant CFTR channel.  
*International Journal of Molecular Science*. 21(11):4024. (2020)  
IF: 4,556

## EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

- I. Bartos C, Jójárt-Laczovich O, Katona G, Budai-Szűcs M, Ambrus R, Bocsik A, **Gróf I**, Deli MA, Szabó-Révész P.  
Optimization of a combined wet milling process in order to produce poly(vinyl alcohol) stabilized nanosuspension.  
*Drug Design, Development and Therapy*. 12:1567-1580. (2018)  
IF: 3,208
- II. Veszelka S, Tóth A, Walter FR, Tóth AE, **Gróf I**, Mészáros M, Bocsik A, Hellinger É, Vastag M, Rákhely G, Deli MA.



Comparison of a rat primary cell-based blood-brain barrier model with epithelial and brain endothelial cell lines: gene expression and drug transport.

*Frontiers in Molecular Neuroscience*. 11:166. (2018)

IF: 3,720

- III. L Kiss E, Berkó S, Gácsi A, Kovács A, Katona G, Soós J, Csányi E, **Gróf I**, Harazin A, Deli MA, Budai-Szűcs M.  
Design and optimization of nanostructured lipid carrier containing dexamethasone for ophthalmic use.  
*Pharmaceutics*. 11(12). pii: E679. (2019)  
IF: 4,773
- IV. Ismail R, Bocsik A, Katona G, **Gróf I**, Deli MA, Csóka I.  
Encapsulation in polymeric nanoparticles enhances the enzymatic stability and the permeability of the GLP-1 analog, liraglutide, across a culture model of intestinal permeability.  
*Pharmaceutics*. 11(11). pii: E599. (2019)  
IF: 4,773
- V. Imre N, Hetényi A, Szabó E, Bodnár B, Szkalisity A, **Gróf I**, Bocsik A, Deli MA, Horvath P, Czibula Á, Monostori É, Martinek TA.  
Routing nanomolar protein cargoes to lipid raft-mediated/caveolar endocytosis through a ganglioside GM1-specific recognition tag.  
*Advanced Science*. 7(4):1902621. (2020)  
IF: 15,804
- VI. Kiss EL, Berkó S, Gácsi A, Kovács A, Katona G, Soós J, Csányi E, **Gróf I**, Harazin A, Deli MA, Balogh GT, Budai-Szűcs M.  
Development and characterization of potential ocular mucoadhesive nano lipid carriers using full factorial design.  
*Pharmaceutics*. 12(7):682. (2020)  
IF: 4,421
- VII. Bíró T, Bocsik A, Jurišić Dukovski B, **Gróf I**, Lovrić J, Csóka I, Deli MA, Aigner Z.  
New approach in ocular drug delivery: in vitro and ex vivo investigation of cyclodextrin containing, mucoadhesive eye drop formulations  
*Drug Design, Development and Therapy*. 15:351-360. (2021)  
IF: 3,216



## 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Deli Máriának és Dr. Bocsik Alexandrának a munkám során nyújtott szakmai irányításért.

Ezúton szeretném megköszönni a Biológiai Barrierék Kutatócsoport valamennyi jelenlegi és egykori munkatársának – Dr. Veszélka Szilvia, Dr. Hoyk Zsófia, Dr. Walter Fruzsina, Dr. Harazin András, Dr. Mészáros Mária, Dr. Ana Raquel Pato Santa Maria, Barna Lilla, Vigh Judit, Porkoláb Gergő, Dr. Sántha Petra, Dr. Kiss Lóránd, és a tudományos diákkörös hallgatóink – a mindennapi nyitott, baráti légkört és a rengeteg szakmai támogatást, segítséget. Külön köszönöm Dr. Kiss Lórándnak és Dr. Kürtiné Bocsik Alexandrának hogy diákkoromban megtanították nekem a kutatáshoz szükséges alapvető kísérletes technikákat.

Köszönöm Dr. Ormos Pálnak és Dr. Nagy Ferencnek, az SZBK Igazgatóinak, Dr. Zimányi Lászlónak a Biofizikai Intézet igazgatójának és Dr. Siklós Lászlónak, a Biofizikai Intézet Molekuláris Neurobiológiai Kutatóegysége vezetőjének, hogy lehetővé tették az intézetben való munkámat. Köszönöm a kutatóegység, a Biofizikai Intézet és az egész kutatóközpont minden munkatársának támogatását, kiemelve Dr. Vizsnyiczai Gaszton segítségét a képanalízis elvégzésében.

Szeretném megköszönni együttműködő partnereinknek, akik lehetővé tették a közös cikkek létrejöttét. Hálás köszönet Dr. Bebők Zsuzsannának, hogy biztosította a számunkra a CFBE sejtvonalat és Dr. Zsembery Ákosnak a bikarbonáttal végzett kísérletek során nyújtott szakmai támogatásáért. Köszönet illeti Dr. Rakonczay Zoltánt, Dr. Kiss Lórándot és Fűr Gabriellát, akik az intracelluláris pH mérést végezték. Köszönöm Dr. Fülöp Líviának és Gyebrovszki Andreának, hogy előállították számunkra a PN159 peptidet, Dr. Daruka Leilának Dr. Pál Csaba csoportjából pedig, hogy letesztelte azt baktériumokon.

Végezetül pedig mélységes hálával tartozom családomnak, Édesanyámnak, Édesapámnak és Testvéreimnek, barátaimnak a feltétlen szeretetért és támogatásért.